

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年6月10日 (10.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/048604 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/02, G01N
33/50, 33/15, C12N 15/55

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014909

(22) 国際出願日: 2003年11月21日 (21.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-339418
2002年11月22日 (22.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞ヶ関1-3-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塚原 克平 (TSUKAHARA, Kappel) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮4丁目4番2号 Ibaraki (JP). 土谷 満美子 (TSUCHIYA, Mamiko) [JP/JP]; 〒300-1216 茨城県牛久市神谷6丁目2番1号 B-103 Ibaraki (JP). 地神 芳文 (JIGAMI, Yoshifumi) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 仲山 賢一 (NAKAYAMA, Kenichi) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6独立行政

法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 梅村 真理子 (UMEMURA, Mariko) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 岡本 美智代 (OKAMOTO, Michiyo) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/048604 A1

(54) Title: METHOD OF SCREENING COMPOUND INHIBITING ENZYMATIC ACTIVITY OF GWT1 GENE PRODUCT

(54) 発明の名称: GWT1遺伝子産物の酵素活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法

(57) Abstract: It becomes possible to screen a compound inhibiting the transportation of a GPI anchor protein into fungal cell wall by a convenient method of assaying transacylation to GlcN-PI with the use of a membrane fraction expressing a GWT1 protein. By inhibiting the process of transporting the GPI anchor protein into cell wall, a novel antifungal agent, which inhibits the synthesis of fungal cell wall and, at the same time, inhibits adhesion to host cells, can be designed.

(57) 要約: GWT1蛋白を発現した膜画分を用いた簡単なGlcN-PIへのアシル基転移反応の測定により、GPIアンカー蛋白質の真菌細胞壁への輸送を阻害する化合物がスクリーニング可能となった。GPIアンカー蛋白質が細胞壁に輸送される過程を阻害することにより、真菌細胞壁の合成を阻害し、同時に宿主細胞への付着も阻害する新規抗真菌剤が創出できる。

明細書

GWT1遺伝子産物の酵素活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法

5 技術分野

真菌の細胞壁合成に関与するGPI合成酵素阻害活性を有する抗真菌剤をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

- 10 本発明者らは、真菌が病原性を発揮するためには宿主細胞に付着することが重要であり、付着に関与する付着因子は一旦細胞膜にGPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカリングした後、細胞壁表層に輸送されることに着目した (非特許文献1/Hamada K et al, Mol. Gen. Genet., 258: 53-59, 1998)。そしてGPIでアンカリングされた蛋白質 (GPIアンカー蛋白質) が細胞壁に輸送される過程を阻
- 15 害することにより、真菌細胞壁の合成を阻害し、同時に宿主細胞への付着も阻害する新規抗真菌剤が創出できると考えて研究に着手した。

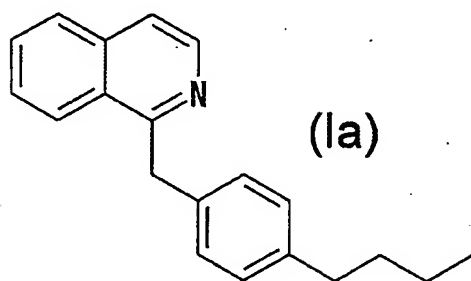
発明の開示

- 本発明の課題は、真菌細胞壁へのGPIアンカー蛋白質の輸送を阻害して真菌細胞
- 20 壁の合成を阻害するとともに、宿主細胞への付着を阻害して、病原性真菌が病原性を発揮できないようにする抗真菌剤を開発することにある。

- 本発明者らはWO 02/04626で、*Saccharomyces cerevisiae*において配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、*Candida albicans*において配列番号3及び5に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、*Schizosac*
- 25 *charomyces pombe*において配列番号7に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、*Aspergillus fumigatus*において配列番号9及び11に記載の塩基配列

- 2 -

を有するDNAがコードする蛋白質が、*Cryptococcus neoformans*において配列番号 1 2 及び 1 3 に記載の塩基配列を有するDNAがコードする蛋白質が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に関与することを見出しGWT1遺伝子と命名した。更に、該遺伝子を欠失した真菌が細胞壁を合成できないこと、式(Ia)に示す化合物 5 が該蛋白質と結合して、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送を阻害し、真菌の細胞壁合成を阻害することを見出した。



そして、GWT1遺伝子産物（以下GWT1蛋白）が、GPIの生合成経路（図1、Kinoshita and Inoue, Curr Opin Chem Biol 2000 Dec;4(6):632-8; Ferguson et al., 10 Biochim Biophys Acta 1999 Oct 8;1455(2-3):327-40) 中のGlcN-PIにアシル基を転移しGlcN-(acyl)PIを合成する活性を有することを見出し、本活性を阻害する化合物をスクリーニングすることにより真菌細胞壁の合成を阻害する化合物を見出すことができると考えて、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、下記1から4を提供するものである。

- 15 [1.]. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、
- (1) 過剰発現させたGWT1遺伝子にコードされる蛋白質と、被検試料とを接触させる工程、
 - (2) GlcN-(acyl)PIを検出する工程、
 - (3) GlcN-(acyl)PIを減少させる被検試料を選択する工程、を含む方法。

20 ここでGWT1とはWO 02/04626に開示された真菌の細胞壁合成遺伝子であり、過剰発現させたとは本来持っていた遺伝子ではなく、外部から導入した遺伝子から発現させることを意味する。

- 3 -

また、GlcN-(acyl)PIとはGPIの生合成経路（図1、Kinoshita and Inoue, Curr Opin Chem Biol 2000 Dec;4(6):632-8; Ferguson et al., Biochim Biophys Acta 1999 Oct 8;1455(2-3):327-40）中のGlucosaminyl-phosphatidylinositol (GlcN-PI) のInositolにアシル基が結合したGlucosaminyl-acylphosphatidylinositol

5 である。

[2]. GWT1遺伝子が下記（a）から（d）のいずれかに記載のDNA、

（a）配列番号：2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA

10 （b）配列番号：1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列を含むDNA

（c）配列番号：1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

15 （d）配列番号：2、4、6、8、10または14記載のアミノ酸配列において若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、

である[1]に記載の抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法。

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば65℃ 4 x SSCにおけるハイブリダイゼーション、次いで65℃で1時間0.1 x SSC中での洗浄である。また別法としてストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド中42℃ 4 x SSCである。また、
20 PerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液中65℃2.5時間ハイブリダイゼーション、次いで1). 2x SSC, 0.05% SDS溶液：25℃5分、2). 2xSSC, 0.05% SDS溶液：25℃15分、3). 0.1xSSC, 0.1% SDS溶液50℃20分の洗浄といった条件も許される。

また、「1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質」は、当業者に公知の方法、例えば、部位特異的
25 変異誘発法（Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

- 4 -

NY) などを用いて調製することができる。また、このような変異は自然界において生じることもある。アミノ酸の変異数は、GlcN-PIにアシル基を転移させる活性が保持される限り特に制限はない。典型的には、30アミノ酸以内であり、好ましくは、10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。アミノ酸

5 の変異部位も、上記活性が保持される限り特に制限はない。

上記ハイブリダイゼーションを利用して調製される蛋白質や変異蛋白質は、通常、配列番号：2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質とそのアミノ酸配列において高い相同性（例えば、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、あるいは95%以上の相同性）を有する。アミノ酸配列の相同

10 性は、BLASTx（アミノ酸レベル）のプログラム(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)に基づいている。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、

15 wordlength = 3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschulら (Nucleic. Acids. Res. 25:3389-3402, 1997) に記載されているように行うことができる。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

20 [3]. アシル化されたGPIを検出する工程が薄相クロマトグラフィーである、[1] または[2]に記載の方法。

[4]. さらに、(4) 選択された被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、GPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否か、または、真菌の増殖を抑制するか否かを検定する工程、を含む、

25 [1]から[3]のいずれかに記載の方法。

以下に本発明に記載された、1. GWT1蛋白を調製する方法、2. アシル基転移

活性の測定方法について開示する。

1. GWT1蛋白を調製する方法

GWT1蛋白は、真菌、好ましくは*S. cerevisiae*、*C. albicans*、*S. pombe*、*A. fumigatus*、*C. neoformans*、更に好ましくは*S. cerevisiae*の膜面分から調製する。ア

- 5 シル基転移活性の測定は、調製した膜面分をそのまま使用してもよいし、更に精製して用いてもよい。真菌に、配列番号1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列のDNAを導入して、GWT1蛋白を過剰発現させることにより、アシル基転移活性の測定を容易に行うことが可能である。以下に*S. cerevisiae*の場合について具体的に説明する。

10 (1)GWT1遺伝子の導入

GWT1遺伝子は、配列番号1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列を基にプライマーを設計し、真菌のDNAを鋳型としてPCRを行うことにより得ることができる。

- 15 GWT1遺伝子を*S. cerevisiae*で働く発現ベクター、例えばYEpl352のマルチクロニングサイトに適当なプロモーター・ターミネーター、例えばpKT10 (Tanaka et al, Mol. Cell Biol., 10:4303-4313, 1990) 由来のGAPDHプロモーター及びGAPDHターミネーターを挿入した発現ベクターに挿入してGWT1発現プラスミドを作製する。*S. cerevisiae*例えばG2-10株を、適当な培地例えばYPD培地(Yeast extract-Polyeptone-Dextrose培地)にて、適当な温度例えば30℃で振とう培養し、対数増殖後期の時点で集菌する。洗浄後、例えば酢酸リチウム法によりGWT1発現プラスミドを*S. cerevisiae*に導入する。酢酸リチウム法についてはYEAST MAKER™ Yeast Transformation System (Clontech社製) User Manualに記載されている。SD(ura-)培地で30℃、2日間培養することによりGWT1過剰発現株および空ベクター導入株を得ることができる。

- 25 また、GWT1遺伝子を導入する菌株は、好ましくは自身のGWT1遺伝子を欠失した欠失株であることが望ましい。GWT1遺伝子を欠失した*S. cerevisiae*は、以下の方

法により得ることができる。

マーカー遺伝子、好ましくは *S. pombe* の his5 遺伝子を鋳型とし、両端に 30 bp 以上好ましくは 40 bp 以上の欠失したい GWT1 遺伝子の配列（例えば配列番号 1 に記載の配列）を含んだ PCR 産物が得られるように設計したプライマーを用い PCR 増幅を行う。PCR 産物を精製し、真菌に導入後、マーカー遺伝子に対応した選択、his5 であれば his⁻ の培地で培養して、欠失株を得ることができる。

S. cerevisiae 以外の真菌の発現ベクター及び遺伝子導入法は、*S. pombe* の発現ベクター pCL 等及びその導入法について Igarashi et al, Nature 353:80-83, 1991 に、*C. albicans* の発現ベクター pRM10 等及びその導入法について Pla J et al, Yeast, 12: 1677-1702, 1996 に、*A. fumigatus* の発現ベクター pAN7-1 等及びその導入法について Punt PJ et al, GENE, 56: 117-124, 1987 に、*C. neoformans* の発現ベクター pPM8 等及びその導入法について Monden P et al, FEMS Microbiol. Lett., 187: 41-45, 2000 に記載されている。

また、*C. albicans* の欠失株の作製法は、Fonzi WA et al, Genetics 134: 717-728, 1993 に記載されている。

(2) 膜画分の調製法

GWT1 遺伝子を導入した *S. cerevisiae* を、適当な培地例えば SD (ura⁻) 液体培地にて、適当な温度例えば 24℃ で振とう培養し、対数増殖中期の時点で集菌する。菌体を TM buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 2 mM MgCl₂) で洗浄した後、適量例えば 2 ml の TM buffer + protease inhibitor (Complete™ (Roche 社製)) にて懸濁し、適量例えば 1.5 ml のガラスビーズを加える。これをボルテックスしては氷上に置く操作を繰り返して（例えば、30 秒間ボルテックスして 30 秒間氷上に置く操作を 10 回繰り返して）菌体を破碎する。

遠心例えば 1,000 g で 5 分間遠心してガラスビーズおよび未破碎の菌体を沈殿させる。上清を別のチューブにとり、遠心例えば 13,000 g で 20 分間遠心することによりオルガネラを含む膜画分 (Total membrane fraction) を沈殿させる。必要な

らば、更に沈殿を1 mlの適当なassay用のバッファーに懸濁し、遠心例えば1,000 gで1分間遠心することにより懸濁されなかった部分を取り除き、上清を遠心例えば13,000 gで20分間遠心して沈殿を適当なassay用のバッファーに再懸濁し膜面分とする。

- 5 *S. cerevisiae*以外の真菌の膜面分調製は、*S. pombe*についてはYoko-o et al, Eur. J. Biochem. 257:630-637 (1998)に、*C. albicans*についてはSentandreu M et al, J. Bacteriol., 180: 282-289, 1998に、*A. fumigatus*についてはMouyna I et al, J. Biol. Chem., 275: 14882-14889, 2000に、*C. neoformans*についてはThompson JR et al, J. Bacteriol., 181: 444-453, 1999に記載の方法により行う
10 ことができる。

別法としてGWT1蛋白は、真菌以外の細胞、例えば哺乳類細胞、昆虫細胞、大腸菌等で発現させ、調製することができる。

- 哺乳類細胞では、例えばCMVプロモーターを持つ過剰発現用ベクターにつないだGWT1を哺乳類細胞に導入し、Petaja-Repo et al., J. Biol. Chem., 276:4416-23,
15 2001に記載の方法により膜面分を調製することができる。

昆虫細胞では、例えばBAC-TO-BAC Baculovirus Expression system (Invitrogen社製)等のバキュロウイルス発現キットを用いてGWT1発現昆虫細胞(Sf9細胞など)を作製し、ここからOkamoto et al., J. Biol. Chem., 276:742-751, 2001に記載の方法により膜面分を調製することができる。

- 20 大腸菌では、例えばpGEX (Pfizer社製)の大腸菌発現用ベクターにGWT1をつなぎ、BL21などの大腸菌に導入しGWT1蛋白を調製することができる。

2. アシル基転移活性の測定方法

- GPIにアシル基を転移する反応の検出は、Costello and Orlean, J. Biol. Chem. (1992) 267:8599-8603; またはFranzot and Doering, Biochem. J. (1999) 340:2
25 5-32に報告されている方法により可能である。以下に具体的な方法の例を挙げるが、以下の実験条件は使用するGWT1遺伝子産物に合わせて最適化することが好ま

しい。

適当な金属イオン (Mg、Mn)、ATP、Coenzyme A、及び好ましくはUDP-GlcNAcが他の反応に使われるのを阻害する阻害剤、例えばキチンの合成阻害剤としてnikkomycin Z、アスパラギン結合型糖鎖の合成阻害剤としてtunicamycinを含むバッフ

- 5 ァーに、1で調製したGWT1遺伝子産物、好ましくはGWT1遺伝子産物を含む膜画分を加え、更に被検化合物を加えて適当な温度で適当な時間（例えば24℃で15分間）保温する。

- その後、適当に標識した、好ましくは放射性同位元素で標識したGlcN-(acyl)PIの前駆体、例えばUDP-GlcNAc、Acyl-Coenzyme A、好ましくはUDP-[¹⁴C]GlcNAcを加えて、更に適当な時間（例えば24℃で1時間）保温する。クロロホルム：メタノール（1:2）を添加し攪拌して反応を止め脂質を抽出する。抽出した反応産物を適当な溶媒、好ましくはブタノールに溶解し、HPLC・薄層クロマトグラフィー（TLC）等の方法、好ましくはTLCにより、反応で生成したGlcN-(acyl)PIを分離する。TLCで展開する場合、展開溶媒は例えばCHCl₃/CH₃OH/H₂O（65:25:4）、CHCl₃/CH₃OH/1M NH₄OH（10:10:3）、CHCl₃/pyridine/HCOOH（35:30:7）等適宜選択することができるが、好ましくはHCl₃/CH₃OH/1M NH₄OH（10:10:3）により展開する。分離したGlcN-(acyl)PIを、標識に対応した方法、放射性同位元素で標識したのであれば、分離したGlcN-(acyl)PIの放射活性により定量する。

- 被検化合物が存在する場合に、生成するGlcN-(acyl)PIが減少すれば、被検化合物にGWT1蛋白によるアシル基転移を抑制する活性があると判断される。

- このようなアシル基転移を抑制する活性が検出された被検試料は、さらに、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、GPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否か、または、真菌の増殖を抑制するか否かを検定することが好ましい。この検定の結果、被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害、GPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害、または、真菌の増殖を阻害した場合には、該試料は抗真菌剤の有力な候補となる。

被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、あるいはGPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否かは、(1). レポータ酵素を用いる方法、(2). 真菌細胞壁の表層糖蛋白質と反応する抗体を用いる方法、(3). 動物細胞に対する付着能により検定する方法、(4). 真菌を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察する方法により検定できる。

(1)～(4)の方法はW0 02/04626の発明の開示に示されており、実施例に具体的に開示されている。(1)～(4)の方法により、好ましくは(1)～(4)の方法を組み合わせる用いることにより、被検試料がGPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する、あるいはGPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害すると判断され、
10 しかも本件発明に記載のDNAがコードする蛋白質を、真菌に過剰発現させることにより、その阻害の程度が減弱する、あるいは阻害が見られなくなる場合に、被検試料は、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

また被検試料が真菌の増殖を抑制するか否かは、通常の抗真菌活性を測定する方法により検定できる (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.) 。

図面の簡単な説明

20 図1は、GPIの生合成経路を示した図である。

図2は、野生株 (WT)、GWT1遺伝子を破壊した $\Delta gwt1$ 株 (Δ)、 $\Delta gwt1$ 株にGWT1遺伝子を導入した株 (Δ/G) から調製した膜画分について、GPIアシル化反応を測定した結果を示す写真である。

図3は、GWT1遺伝子を開示しているW002/04626の表1に記載の、実施例B2の化合物 (1- (4-ブチルベンジル) イソキノリン、) 及び、実施例B60の化合物 (N-(3-(4-(1-イソキノリルメチル) フェニル)-2-プロピニル) アセトアミド) のア

- 10 -

シル化GIP検出系におけるGPIアシル化反応の阻害活性を測定した結果を示す写真である。

図4は、GWT1遺伝子を開示しているW002/04626の表1に記載の、実施例B73の化合物（N-(3-(4-(1-イソキノリルメチル)フェニル)プロピル)-N-メチルアセトアミド、）及び、実施例B85の化合物（5-ブチル-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール）のアシル化GIP検出系におけるGPIアシル化反応の阻害活性を測定した結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

10 以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

[実施例1] GWT1蛋白を発現した膜画分の調製

(1). GWT1発現プラスミドの作製

S. cerevisiae で働く発現ベクターを作製するため、YEp352のマルチクローニングサイトにpKT10 (Tanaka et al, Mol. Cell Biol., 10:4303-4313, 1990) 由来のGAPDHプロモーターおよびGAPDHターミネーターを挿入し、更にマルチクローニングサイトをpUC18マルチクローニングサイトに置き換えてYEp352GAPIIを作製した。またGWT1遺伝子の挿入を容易にするため、マルチクローニングサイトに存在するSalIサイトをClaIサイトに変換したYEp352GAPIIClaI ΔSalを作製した。

20 配列番号1に記載の塩基配列を含む*S. cerevisiae* GWT1遺伝子を配列番号15に記載のプライマーおよび配列番号16に記載のプライマーを用いて増幅し、YEp352GAPIIClaI ΔSalベクターのマルチクローニングサイトに挿入してGWT1過剰発現プラスミドを作製した。

(2). GWT1遺伝子を欠失した*S. cerevisiae* Δgwt1株の作製

25 *S. pombe*のhis5遺伝子 (Longtine MS et al, Yeast, 14: 953-961, 1998) を鋳型とし、配列番号17及び配列番号18をプライマーとして、両端にGWT1配列を

- 11 -

含むhis5カセットをPCRで増幅した。

*S. cerevisiae*を培養・集菌し、上述のPCR産物で形質転換した。SD(His-)培地で30℃、5～7日間培養することによりGWT1遺伝子を欠失した Δ gwt1株を得た。

(3)GWT1発現細胞の作製

- 5 Δ gwt1株を、YPD培地(Yeast extract-Polypeptone-Dextrose培地)にて、30℃で振とう培養し、対数増殖後期の時点で集菌した。洗浄後、酢酸リチウム法 (YEAST MAKER™ Yeast Transformation System (Clonetech社製)) によりGWT1発現プラスミドを Δ gwt1株に導入した。SD(ura-)培地で30℃、2日間培養することによりGWT1遺伝子を過剰発現させた Δ gwt1株を得た。

10 (4)膜画分の調製

- S. cerevisiae* 野生株、GWT1遺伝子を欠失した Δ gwt1株、あるいは Δ gwt1株にGWT1過剰発現プラスミドを導入した株を、100 mlのYPD培地にて24℃で振とう培養し、対数増殖中期 ($OD_{600}=1\sim3$) の時点で集菌した。菌体をTM buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 2 mM $MgCl_2$)で洗浄した後、2 mlのTM buffer + protease inhibitor
- 15 (Complete™ (Roche社製) 1 tablet / 25 ml)にて懸濁し、1.5 mlのガラスビーズを加えた。これを30秒間ボルテックスして30秒間氷上に置く操作を10回繰り返すことにより菌体を破碎した。菌体破碎液を新しいチューブに移し、4℃で1000g、5分間遠心してガラスビーズおよび未破碎の菌体を沈殿させた。上清を別のチューブにとり、4℃で13,000g、20分間遠心することによりオルガネラを含む膜画分(Total membrane fraction)を沈殿させ、膜画分とした。
- 20

(5)アシル化されたGPIの検出

- GPI生合成反応は、N-acetyl-glucosaminyl-phosphatidylinositol (GlcNAc-PI)が脱アセチル化されることによりGlucosaminyl-phosphatidylinositol (GlcN-PI)を生じ、これにアシル基が付加することによりGlucosaminyl-acylphosphatidylinositol (GlcN-(acyl)PI)へと進むことが知られている (図1)。そこで、Gwt1タンパク質がこのアシル基転移反応に関わっているかを以下の方法によって調べた。
- 25

- 12 -

調製した膜画分(300 μ g protein)を50 mM Tris-HCl, pH7.5, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM ATP, 1 mM Coenzyme A, 21 μ g/ml tunicamycin, 10 μ M nikkomycin Z, 0.5 mM Dithiothreitolに対して希釈し全量を 140 μ lに合わせ、反応液とした。これを24°Cで15分保温した後、15 μ CiのUDP-[14 C]GlcNAcをチューブに添加した。24°Cにて1時間保温した後、1 mlのクロロホルム：メタノール (1:2) を添加し攪拌することにより反応を止めて、脂質を抽出した。乾燥させた脂質をブタノール抽出により脱塩し、薄層クロマトグラフィー ($HCl_3/CH_3OH/1M NH_4OH(10:10:3)$) により、アシル化されたGPI (GlcN-(acyl)PI) 、アシル化されていないGPI (GlcN-PI) 、アシル化も脱アセチル化もされていないGPI (GlcNAc-PI) を分離し、オートラジオグラフィーにより各スポットを検出した。

その結果、図2に示すように、野生株ではアシル化されたGPIのスポットが検出されたのに対し、GWT1遺伝子を破壊した株 ($\Delta gwt1$) ではアシル化GPIのスポットは全く検出されなかった。また、 $\Delta gwt1$ 株にGWT1遺伝子を導入した株では、アシル化GPIのスポットが検出され、アシル化能が回復していた。以上のことより、Gwt1タンパク質がGPIへのアシル基転移反応を触媒する酵素であることが示された。

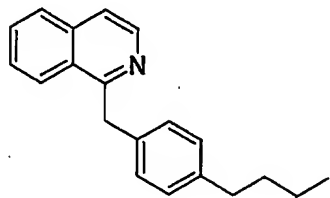
以上の結果より、本GPI合成酵素活性測定系にGWT1遺伝子産物の活性を阻害活性を有する化合物が含まれていれば、アシル化したGlcN-(acyl)PIのスポットの強度が減弱あるいは消失すると考えられ、GlcN-(acyl)PIのスポットの強度を指標としてGWT1遺伝子産物の酵素活性を阻害する化合物、更には真菌の細胞壁合成を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能であると考えられた。

(6) アシル化反応を阻害する化合物のスクリーニング

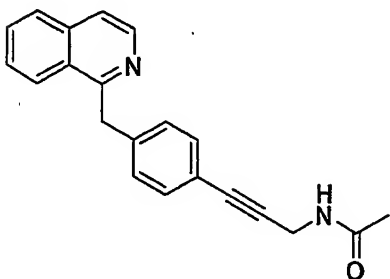
GWT1遺伝子を開示しているW002/04626において、GWT1遺伝子産物の活性を反映したレポータ系での化合物の抑制活性を示した表1に記載の、実施例B 2、実施例B 60、実施例B 73、実施例B 85に記載の化合物について、これらの化合物を(5)に記載のアシル化GIP検出系に添加して、GPIアシル化反応を阻害する活性を測定した。これら化合物の構造は以下に記載する通りである。

- 13 -

実施例 B 2 に記載の化合物 : 1-(4-ブチルベンジル) イソキノリン

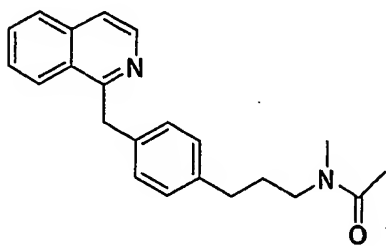


実施例 B 60 に記載の化合物 : N-(3-(4-(1-イソキノリルメチル)フェニル)-2-プロピニル)アセトアミド

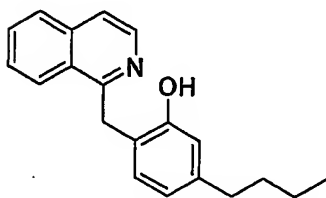


5

実施例 B 73 に記載の化合物 : N-(3-(4-(1-イソキノリルメチル)フェニル)プロピル)-N-メチルアセトアミド



実施例 B 85 に記載の化合物 : 5-ブチル-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール



10

結果を図 3 及び図 4 に示した。W002/04626 表 1 の中で、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の IC_{50} で阻害活性を表している実施例 B 2 及び実施例 B 85 に記載の化合物では、用量依

- 14 -

存的なアシル化GPIのスポット強度の減少が見られるのに対し、IC₅₀が50 μ g/mlの実施例B 7 3の化合物では、スポット強度の減少が見られなかった。

この結果から、本GPIアシル化反応の測定系を用いることにより、GWT1遺伝子産物の酵素活性阻害する化合物をスクリーニングすることが可能であることが明らかとなった。

5

産業上の利用の可能性

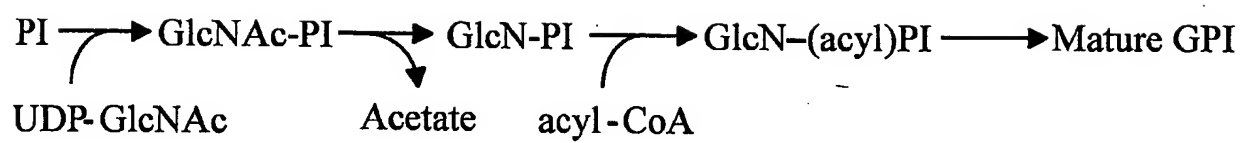
GPIアンカー蛋白質の真菌細胞壁への輸送を阻害する化合物が、簡単なアシル基転移活性測定によりスクリーニング可能となった。

請求の範囲

1. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (1) 過剰発現させたGWT1遺伝子にコードされる蛋白質と、被検試料とを接触
5 させる工程、
 - (2) GlcN-(acyl)PIを検出する工程、
 - (3) GlcN-(acyl)PIを減少させる被検試料を選択する工程、を含む方法。
2. GWT1遺伝子が下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA、
 - (a) 配列番号：2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列からなる
10 蛋白質をコードするDNA
 - (b) 配列番号：1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列を含むDNA
 - (c) 配列番号：1、3、5、7、9、11、12または13に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA
 - 15 (d) 配列番号：2、4、6、8、10または14に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、である請求項1に記載の抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法。
3. アシル化されたGPIを検出する工程が薄相クロマトグラフィーである、請求
20 項1または2に記載の方法。
4. さらに、(4) 選択された被検試料が、GPIアンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、GPIアンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否か、または、真菌の増殖を抑制するか否かを検定する工程、を含む、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

1 / 4

図 1



2 / 4

図 2

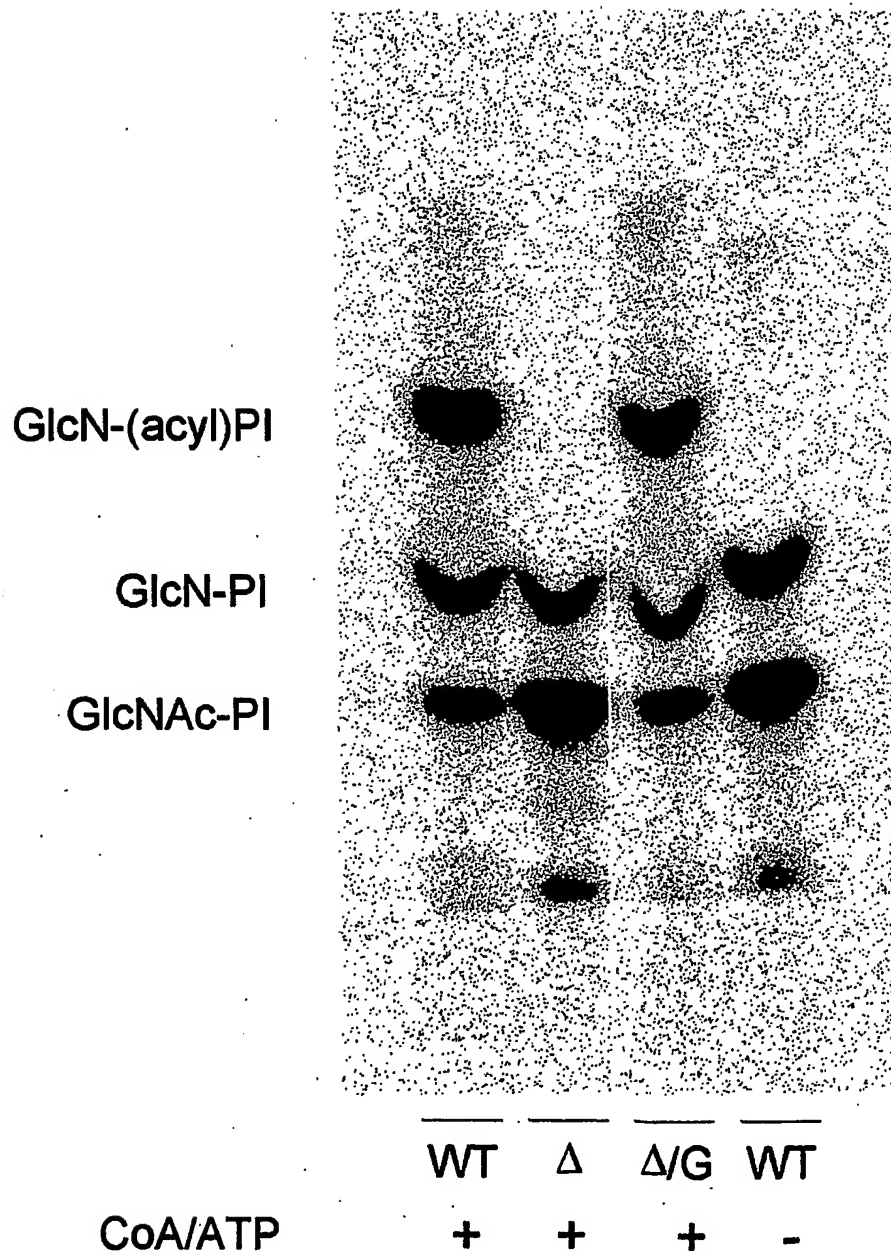


図 3

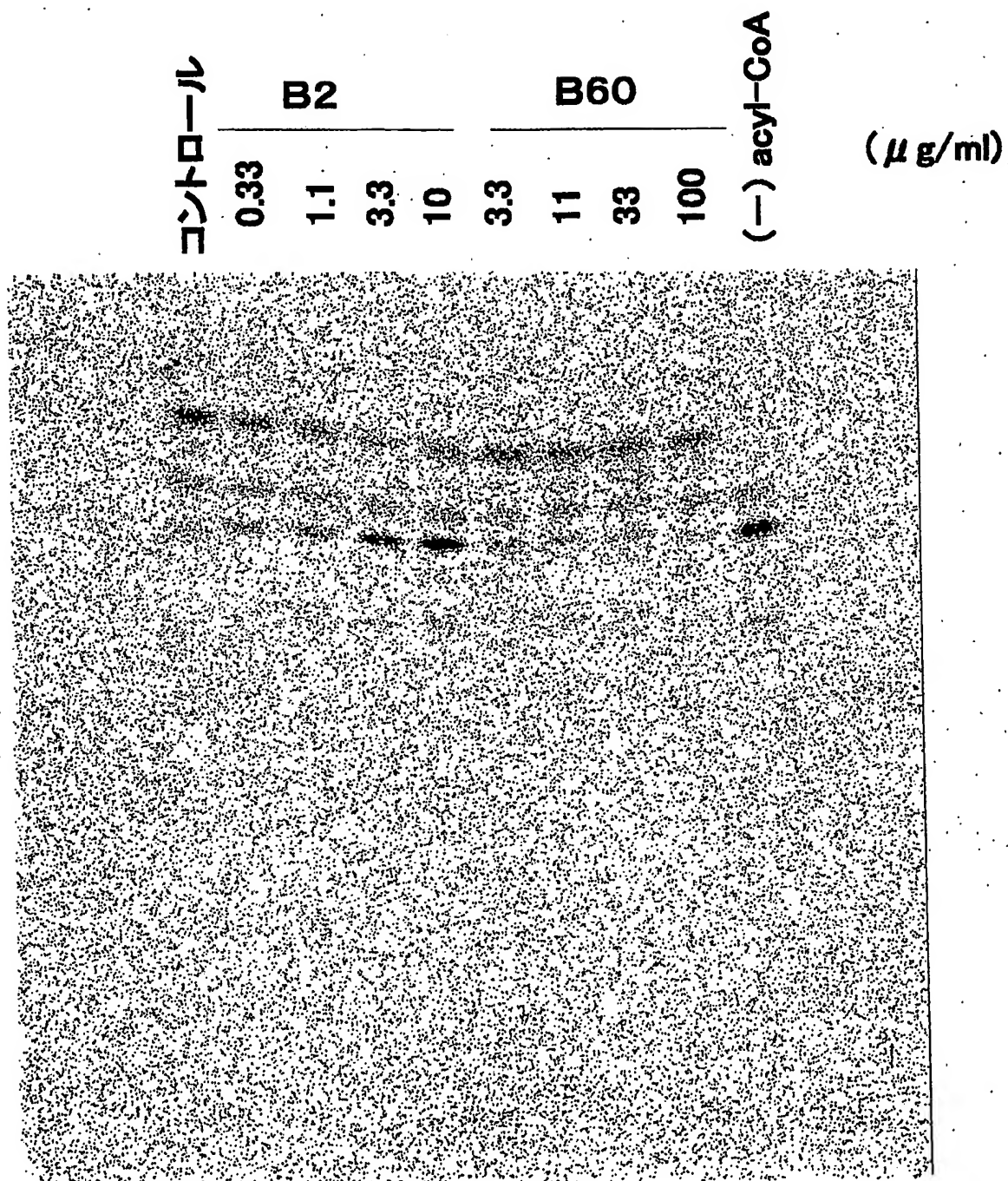
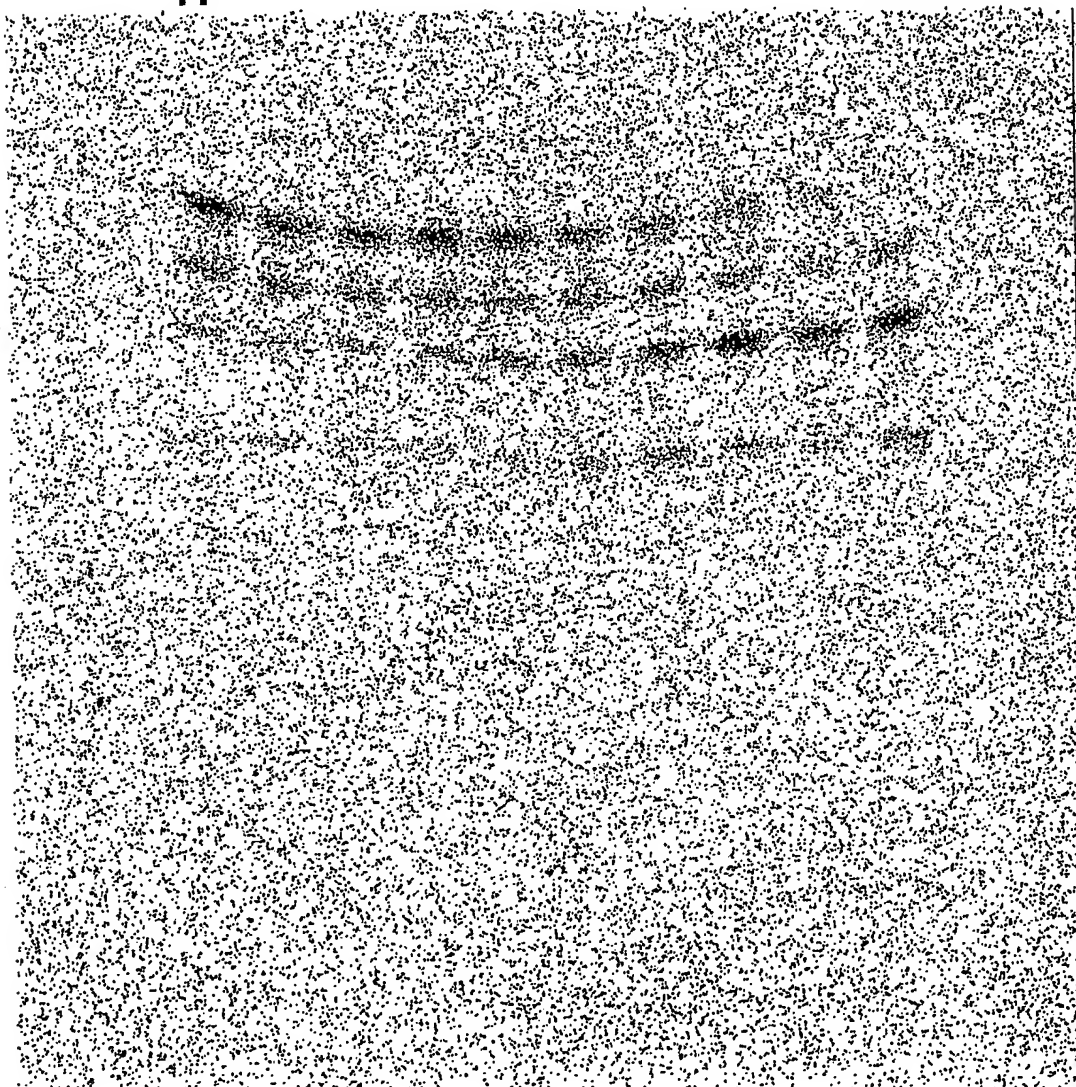


図 4

| コントロール | B73 | | | | B85 | | | | (—) acyl-CoA | (μg/ml) |
|--------|-----|----|----|-----|------|-----|-----|----|--------------|---------|
| | 3.3 | 11 | 33 | 100 | 0.33 | 1.1 | 3.3 | 10 | | |



1 / 7 2

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Method for a screening of an inhibitor of GWT1 gene product

<130> E1-A0209P

<150> JP 2002-339418

<151> 2002-11-22

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1497

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1494)

<400> 1

2 / 7 2

atg gca aca gta cat cag aag aat atg tcg act tta aaa cag aga aaa 48

Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys

1

5

10

15

gag gac ttt gtg aca ggg ctc aat ggc ggt tct ata aca gaa att aac 96

Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn

20

25

30

gca gtg aca tca att gct ttg gta act tac ata tca tgg aac tta ttg 144

Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu

35

40

45

aaa aat tcc aac ctt atg cct cct ggc att tcc agc gtg caa tac ata 192

Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile

50

55

60

att gat ttt gca ttg aac tgg gtt gct ttg ctt cta tct att act att 240

Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile

65

70

75

80

tat gct agt gaa cca tac ctt cta aac acg cta ata ctg tta cct tgt 288

Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys

85

90

95

ttg ctc gca ttc ata tat gga aaa ttt act agc tcg agt aaa cct tct 336

Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser

3 / 7 2

100

105

110

aat cca ata tac aat aaa aaa aaa atg att aca cag cgg ttc caa cta 384

Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu

115

120

125

gaa aaa aag ccg tat att act gcg tat cgt ggt ggg atg ctt att ctg 432

Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu

130

135

140

act gct att gcc atc ttg gct gta gat ttt cca att ttc cca agg agg 480

Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg

145

150

155

160

ttt gcc aag gtg gaa act tgg ggg aca tcc ctg atg gat ctt ggt gta 528

Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val

165

170

175

gga tca ttc gtt ttc agt aac ggt att gtt tct tct agg gca ctg ttg 576

Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu

180

185

190

aaa aac cta agc ttg aag agt aaa ccc agc ttc tta aaa aat gca ttt 624

Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe

195

200

205

4 / 7 2

aat gcc tta aaa tca gga gga act cta ttg ttc cta gga ttg ctg agg 672

Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg

210

215

220

ttg ttt ttt gta aaa aat ttg gaa tat caa gaa cat gtc aca gaa tat 720

Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr

225

230

235

240

ggg gtt cat tgg aat ttt ttt atc acc cta tca ttg ttg cca ctt gta 768

Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val

245

250

255

ttg acc ttt att gat ccc gtc aca aga atg gtt cca cgc tgc tca att 816

Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile

260

265

270

gca ata ttc att tca tgc att tat gaa tgg cta ctt tta aag gac gat 864

Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp

275

280

285

cgc act tta aac ttt tta att ttg gct gat aga aat tgt ttc ttc agt 912

Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser

290

295

300

gct aat aga gaa ggc atc ttc tca ttt cta ggt tat tgc tcg att ttt 960

Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe

5 / 7 2

| | | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| 305 | 310 | 315 | 320 | |
| ctt tgg ggc caa aac acg gga ttt tac ttg ttg gga aat aaa cca act | | | | 1008 |
| Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr | | | | |
| | 325 | 330 | 335 | |
| tta aac aat ctt tat aag cct tct acg caa gac gta gtt gca gca tca | | | | 1056 |
| Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser | | | | |
| | 340 | 345 | 350 | |
| aag aag tct tgc act tgg gac tat tgg act tca gta acc cca tta agt | | | | 1104 |
| Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser | | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| ggc ctc tgt ata tgg agt aca att ttt ctt gtt atc agc cag ttg gtt | | | | 1152 |
| Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val | | | | |
| | 370 | 375 | 380 | |
| ttt caa tac cat cct tat agt gtt tca aga agg ttt gct aac tta cca | | | | 1200 |
| Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro | | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 | |
| tat act ttg tgg gtc att act tat aat tta cta ttt ttg act ggg tac | | | | 1248 |
| Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr | | | | |
| | 405 | 410 | 415 | |

6 / 7 2

tgc ttg act gac aaa att ttc ggt aat tct tcg gaa tat tat aaa gtt 1296

Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val

420

425

430

gcc gaa tgc ttg gaa tca atc aac tcc aat ggg ttg ttt tta ttt ttg 1344

Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu

435

440

445

ttg gca aat gtc tct act ggt tta gtc aat atg tct atg gtc acg ata 1392

Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile

450

455

460

gat tct tca ccc tta aaa tca ttc ctg gtt ttg ttg gca tac tgc tca 1440

Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser

465

470

475

480

ttc ata gct gtc ata tcg gtt ttc ttg tat aga aaa aga ata ttc att 1488

Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile

485

490

495

aag cta taa

1497

Lys Leu

7 / 7 2

<211> 498

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn

20 25 30

Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu

35 40 45

Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile

50 55 60

Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile

65 70 75 80

Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys

85 90 95

Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser

100 105 110

8 / 7 2

Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu

115

120

125

Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu

130

135

140

Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg

145

150

155

160

Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val

165

170

175

Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu

180

185

190

Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe

195

200

205

Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg

210

215

220

Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr

225

230

235

240

Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val

245

250

255

9 / 7 2

Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile

260

265

270

Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp

275

280

285

Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser

290

295

300

Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe

305

310

315

320

Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr

325

330

335

Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser

340

345

350

Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser

355

360

365

Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val

370

375

380

Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro

1 0 / 7 2

385 390 395 400

Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr

405 410 415

Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val

420 425 430

Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu

435 440 445

Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile

450 455 460

Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser

465 470 475 480

Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile

485 490 495

Lys Leu

<210> 3

<211> 1458

11 / 72

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1455)

<400> 3

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg 48

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

1 5 10 15

act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta 96

Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu

20 25 30

tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta 144

Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu

35 40 45

gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc 192

Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser

50 55 60

att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt 240

Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val

1 2 / 7 2

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca 288 | | | |
| Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa 336 | | | |
| Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg 384 | | | |
| Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca 432 | | | |
| Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta 480 | | | |
| Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa 528 | | | |
| Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln | | | |
| 165 | 170 | 175 | |

1 3 / 7 2

ttg atc aag aac cac acc gac aac tac aaa ttt agt tgg aag agt tat 576

Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr

180

185

190

ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt 624

Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val

195

200

205

tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa 672

Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu

210

215

220

cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg 720

His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly

225

230

235

240

ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt 768

Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val

245

250

255

cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att gct tat gag gta gcg 816

Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala

260

265

270

ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga 864

Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg

1 4 / 7 2

275

280

285

ctt gaa tct ctc atc acc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att 912

Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile

290

295

300

gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt 960

Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val

305

310

315

320

tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att 1008

Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile

325

330

335

cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca 1056

Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser

340

345

350

gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta 1104

Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu

355

360

365

gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca 1152

Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser

370

375

380

1 5 / 7 2

aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tcg tac aat 1200

Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn

385 390 395 400

gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg 1248

Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly

405 410 415

aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt 1296

Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe

420 425 430

atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc 1344

Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile

435 440 445

aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc 1392

Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly

450 455 460

tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag 1440

Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys

465 470 475 480

atc tac atc aag ctt tag 1458

Ile Tyr Ile Lys Leu

1 6 / 7 2

485

<210> 4

<211> 485

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 4

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

1 5 10 15

Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu

20 25 30

Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu

35 40 45

Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser

50 55 60

Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val

65 70 75 80

Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro

85 90 95

17 / 72

Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu

100

105

110

Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu

115

120

125

Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro

130

135

140

Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu

145

150

155

160

Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln

165

170

175

Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr

180

185

190

Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val

195

200

205

Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu

210

215

220

His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly

1 8 / 7 2

225 230 235 240

Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val

245 250 255

Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala

260 265 270

Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg

275 280 285

Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile

290 295 300

Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val

305 310 315 320

Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile

325 330 335

Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser

340 345 350

Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu

355 360 365

19 / 72

Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser

370

375

380

Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn

385

390

395

400

Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly

405

410

415

Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe

420

425

430

Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile

435

440

445

Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly

450

455

460

Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys

465

470

475

480

Ile Tyr Ile Lys Leu

485

20 / 72

<211> 1458

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1455)

<400> 5

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg 48

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

1 5 10 15

act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta 96

Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu

20 25 30

tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta 144

Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu

35 40 45

gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc 192

Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser

50 55 60

att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt 240

21 / 72

Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val

65 70 75 80

att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca 288

Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro

85 90 95

tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa 336

Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu

100 105 110

cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg 384

Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu

115 120 125

ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca 432

Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro

130 135 140

aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta 480

Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu

145 150 155 160

gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa 528

Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln

165 170 175

2 2 / 7 2

ttg atc aag aac cac acc gac aat tac aaa ttt agt tgg aag agt tat 576

Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr

180

185

190

ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt 624

Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val

195

200

205

tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa 672

Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu

210

215

220

cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg 720

His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly

225

230

235

240

ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt 768

Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val

245

250

255

cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att ggt tat gag gta gcg 816

Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala

260

265

270

ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga 864

2 3 / 7 2

Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg

275

280

285

ctt gaa tct ctc atc gcc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att 912

Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile

290

295

300

gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt 960

Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val

305

310

315

320

tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att 1008

Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile

325

330

335

cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca 1056

Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser

340

345

350

gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta 1104

Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu

355

360

365

gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca 1152

Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser

370

375

380

2 4 / 7 2

aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tcg tac aat 1200
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn
385 390 395 400

gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg 1248
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly
405 410 415

aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt 1296
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe
420 425 430

atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc 1344
Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile
435 440 445

aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc 1392
Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly
450 455 460

tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag 1440
Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys
465 470 475 480

atc tac atc aag ctt tag 1458

25 / 72

Ile Tyr Ile Lys Leu

485

<210> 6

<211> 485

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 6

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

1

5

10

15

Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu

20

25

30

Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu

35

40

45

Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser

50

55

60

Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val

65

70

75

80

Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro

26 / 72

85

90

95

Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu

100

105

110

Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu

115

120

125

Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro

130

135

140

Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu

145

150

155

160

Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln

165

170

175

Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr

180

185

190

Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val

195

200

205

Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu

210

215

220

27 / 72

His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly

225 230 235 240

Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val

245 250 255

Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala

260 265 270

Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg

275 280 285

Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile

290 295 300

Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val

305 310 315 320

Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile

325 330 335

Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser

340 345 350

Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu

355 360 365

28 / 72

Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser

370

375

380

Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn

385

390

395

400

Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly

405

410

415

Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe

420

425

430

Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile

435

440

445

Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly

450

455

460

Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys

465

470

475

480

Ile Tyr Ile Lys Leu

485

29 / 72

<210> 7

<211> 1380

<212> DNA

<213> Schizosaccharomyces pombe

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1380)

<400> 7

atg tca tac aaa ttg gaa aaa gaa gca ttt gtc tca aac ctg acg ggt 48

Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly

1

5

10

15

tca agt tcc att gag aca tgt ggc ttg tta tta ata gga att gct tgc 96

Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys

20

25

30

aac gtt ttg tgg gta aac atg act gcg aga aac atc tta ccc aaa ggg 144

Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly

35

40

45

aat ctt ggg ttt ctt gtt gag ttt ttc atc ttt tgc tta att cca tta 192

Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu

50

55

60

30 / 72

ttt gtc att tac gtt tca tcg aaa gtt ggc gtt ttc act ctt tgc ata 240

Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile

65

70

75

80

gcc tct ttt ttg cct tcc ttc gtc ctt cat gtt ata agt cca att aat 288

Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn

85

90

95

tgg gat gtg ctg aga aga aaa cct ggt tgt tgt ctt act aaa aaa aat 336

Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn

100

105

110

gaa aat act ttt gat cga cga att gct gga gtc aca ttt tat cgt tct 384

Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser

115

120

125

caa atg atg ttg gtt act gtc act tgc atc ctg gcc gtt gac ttt acc 432

Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr

130

135

140

ctt ttc ccg agg aga tat gcc aaa gtt gaa acc tgg gga aca tca ctg 480

Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu

145

150

155

160

atg gat ctt ggt gtt gga tct ttc atg ttt tct tca ggt act gtg gct 528

Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala

3 1 / 7 2

165

170

175

gga cgg aaa aat gac att aaa aaa cca aat gcg ttt aaa aat gta ttg 576

Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu

180

185

190

tgg aat tct ttc atc ctt ttg att tta gga ttt gcg cgc atg ttt tta 624

Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu

195

200

205

acg aaa agc atc aat tac caa gaa cat gta agc gaa tat ggc atg cat 672

Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His

210

215

220

tgg aac ttt ttt ttc acc cta ggt ttc atg gct ctt ggc gta ttt ttt 720

Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe

225

230

235

240

ttt cgt cgt tct tta aaa aaa gtc tcc tat ttt aat tta gca acc ttc 768

Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe

245

250

255

att act ctt ctt cat cat tgt ttg ctt gtt tta acc cct ttc caa aaa 816

Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys

260

265

270

3 2 / 7 2

tgg gca cta tcc gcc ccc aga aca aat att ttg gct cag aat aga gag 864

Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu

275

280

285

ggt att gct tct ctt ccc gga tac att gct att tac ttt tat gga atg 912

Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met

290

295

300

tat acc ggt agt gta gtt ttg gct gat cga cct cta atg tat act aga 960

Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg

305

310

315

320

gct gag tcg tgg aag cgc ttt caa cgt cta tta ttc ccg cta tgc att 1008

Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile

325

330

335

ttg tta gtg ttg tat ctt gtg tct aac ttt ttg tca gtt ggt gtt tct 1056

Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser

340

345

350

cgc cga ctt gct aat acg cct tat gtt gcg aat gtt gcc ttt atc aat 1104

Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn

355

360

365

atg ttt ttt ctt act ata tac ata ctt att gat gcc tat tta ttc cca 1152

Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro

3 3 / 7 2

370 375 380

tct tct gtg cca tat gga agt cgc gtc ccc aaa ctg ctt gaa gat gcc 1200
Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala
385 390 395 400

aat aat aat ggc ttg ttg gtg ttt ttg att gct aac gtt tta aca gga 1248
Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly
405 410 415

gta gtt aat tta tcg ttc gac acc ctt cat tct agc aat gca aaa ggc 1296
Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly
420 425 430

ttg aca atc atg act atg tat ctt ttt att att tgc tat atg gca cat 1344
Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His
435 440 445

tgg ctt gct caa cac gga att cgt ttt cgc ctt tag 1380
Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu
450 455 460

<210> 8

<211> 459

<212> PRT

3 4 / 7 2

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 8

Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly

1 5 10 15

Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys

20 25 30

Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly

35 40 45

Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu

50 55 60

Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile

65 70 75 80

Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn

85 90 95

Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn

100 105 110

Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser

115 120 125

35 / 72

Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr

130

135

140

Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu

145

150

155

160

Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala

165

170

175

Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu

180

185

190

Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu

195

200

205

Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His

210

215

220

Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe

225

230

235

240

Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe

245

250

255

Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys

3 6 / 7 2

260

265

270

Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu

275

280

285

Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met

290

295

300

Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg

305

310

315

320

Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile

325

330

335

Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser

340

345

350

Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn

355

360

365

Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro

370

375

380

Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala

385

390

395

400

37 / 72

Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly

405

410

415

Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly

420

425

430

Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His

435

440

445

Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu

450

455

<210> 9

<211> 1576

<212> DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*

<220>

<221> CDS

<222> (31).. (1536)

<400> 9

aaggtgcaaa tcccgcggca ttgagtcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc 54

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg

38 / 72

aaa gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc 102
Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile
10 15 20

aac gcc gtc acc ttg gtt gct tgc gta tcc gtt ttt ctg tgg tca att 150
Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile
25 30 35 40

cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac agc gcc gct gcc ctt 198
Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu
45 50 55

ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc ttg ttc gca acc act 246
Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr
60 65 70

tta tac tct tgc gcg cct ctt ctt ctc aat ctc ctt cta ata tct ccc 294
Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro
75 80 85

gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct cgg acc ccc gtc aaa 342
Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys
90 95 100

gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg aaa gat gac tgc aaa 390

39 / 72

Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys

105 110 115 120

cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att cat cca ttt ctc acg 438

His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr

125 130 135

aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc atc gct atc ttg gct 486

Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala

140 145 150

gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc aag gta gaa aac tgg 534

Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp

155 160 165

ggg aca tca ctc atg gat ctg ggc gtt gga tgc ttt gtc ttt tgc ggc 582

Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly

170 175 180

gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc agg acc aat ggc tct 630

Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser

185 190 195 200

aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg tgc acg cga cac tct 678

Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser

205 210 215

40 / 72

att cct ctg ctc gtc ctc ggc ctg att cgg cta tac agc gtc aaa ggc 726

Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly

220

225

230

ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac ggc gta cat tgg aac ttc 774

Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe

235

240

245

ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg gag gtc ttc gac gcc 822

Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala

250

255

260

ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc tcc gtg ggg atc gcc 870

Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala

265

270

275

280

gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac ttg aaa agc tac atc 918

Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile

285

290

295

ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc aag aat cgt gaa ggc 966

Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly

300

305

310

gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt ctt gct ggt cgt gcg 1014

41 / 72

Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala

315

320

325

atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct ttc tca aga agc cca 1062

Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro

330

335

340

gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt ggc gtg caa gcg tta 1110

Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu

345

350

355

360

gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act tat gcg atg gga tac 1158

Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr

365

370

375

gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct aac atg ccc tat gtc 1206

Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val

380

385

390

ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg ttt gtg ttc tgc ctg 1254

Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu

395

400

405

atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg aca acg act caa gag 1302

Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu

410

415

420

4 2 / 7 2

agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc cga atc atg tcg gcc 1350

Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala

425

430

435

440

ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg gcc aat ctt ctg act 1398

Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr

445

450

455

gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat gct aat aca gcg cag 1446

Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln

460

465

470

gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att atc aca ggg gtt gct 1494

Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala

475

480

485

cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt cct ttc tag 1536

Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu Pro Phe

490

495

500

ggtatttacg agcaattggt ggtgtgttga agatatatag 1576

<210> 10

<211> 501

43 / 72

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 10

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu

1 5 10 15

Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser

20 25 30

Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe

35 40 45

Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val

50 55 60

Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu

65 70 75 80

Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr

85 90 95

Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala

100 105 110

Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser

44 / 72

115

120

125

Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val

130

135

140

Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg

145

150

155

160

Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly

165

170

175

Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu

180

185

190

Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg

195

200

205

Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu

210

215

220

Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr

225

230

235

240

Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro

245

250

255

45 / 72

Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr

260

265

270

Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu

275

280

285

Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser

290

295

300

Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu

305

310

315

320

Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg

325

330

335

Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu

340

345

350

Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu

355

360

365

Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg

370

375

380

Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr

385

390

395

400

4 6 / 7 2

Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala

405

410

415

Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe

420

425

430

Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile

435

440

445

Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser

450

455

460

Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr

465

470

475

480

Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile

485

490

495

Lys Val Leu Pro Phe

500

<210> 11

<211> 1648

<212> DNA

47 / 72

<213> *Aspergillus fumigatus*

<220>

<221> intron

<222> (122).. (198)

<220>

<221> CDS

<222> (26).. (121)

<220>

<221> CDS

<222> (199).. (1608)

<400> 11

gcaaatcccg cggcattgag tcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc aaa 52

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys

1

5

gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc aac 100

Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn

10

15

20

25

gcc gtc acc ttg gtt gct tcg gttcgtgtta ctatcttatt gtggetactt 151

Ala Val Thr Leu Val Ala Ser

48 / 72

cgctacatt gtttctcgac taaccgagtc tctttgcgat caatcag gta tcc gtt 207

Val Ser Val

35

ttt ctg tgg tca att cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac 255

Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr

40

45

50

agc gcc gct gcc ctt ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc 303

Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile

55

60

65

ttg ttc gca acc act tta tac tct tgc ggc cct ctt ctt ctc aat ctc 351

Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu

70

75

80

ctt cta ata tct ccc gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct 399

Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro

85

90

95

cgg acc ccc gtc aaa gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg 447

Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly

100

105

110

115

aaa gat gac tcg aaa cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att 495

49 / 72

Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile

120

125

130

cat cca ttt ctc acg aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc 543

His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys

135

140

145

atc gct atc ttg gct gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc 591

Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala

150

155

160

aag gta gaa aac tgg ggt aca tca ctc atg gat ctg gcc gtt gga tgc 639

Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser

165

170

175

ttt gtc ttt tgc gcc gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc 687

Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser

180

185

190

195

agg acc aat gcc tct aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg 735

Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala

200

205

210

tcg acg cga cac tct att cct ctg ctc gtc ctc gcc ctg att cgg cta 783

Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu

215

220

225

50 / 72

tac agc gtc aaa ggc ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac ggc 831

Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly

230

235

240

gta cat tgg aac ttc ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg 879

Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val

245

250

255

gag gtc ttc gac gcc ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc 927

Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu

260

265

270

275

tcc gtg ggg atc gcc gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac 975

Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp

280

285

290

ttg aaa agc tac atc ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc 1023

Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser

295

300

305

aag aat cgt gaa ggc gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt 1071

Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe

310

315

320

ctt gct ggt cgt gcg atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct 1119

51 / 72

Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser

325

330

335

ttc tca aga agc cca gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt 1167

Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu

340

345

350

355

ggc gtg caa gcg tta gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act 1215

Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr

360

365

370

tat gcg atg gga tac gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct 1263

Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala

375

380

385

aac atg ccc tat gtc ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg 1311

Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu

390

395

400

ttt gtg ttc tgc ctg atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg 1359

Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg

405

410

415

aca acg act caa gag agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc 1407

Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser

420

425

430

435

52 / 72

cga atc atg tcg gcc ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg 1455

Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu

440

445

450

gcc aat ctt ctg act gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat 1503

Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp

455

460

465

gct aat aca gcg cag gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att 1551

Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile

470

475

480

atc aca ggg gtt gct cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt 1599

Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu

485

490

495

cct ttc tag ggtatttacg agcaattggt ggtgtgttga agatatatag 1648

Pro Phe

500

<210> 12

<211> 2045

<212> DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

5 3 / 7 2

<220>

<221> intron

<222> (137).. (198)

<220>

<221> intron

<222> (892).. (942)

<220>

<221> intron

<222> (1636).. (1686)

<220>

<221> CDS

<222> (44).. (2001)

<400> 12

gtcatagcat taaatccccg ccataataag ctactgaatt gca atg ggg gat tac 55

Met Gly Asp Tyr

1

aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca ggt gct tct atc 103

Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro Gly Ala Ser Ile

5

10

15

20

5 4 / 7 2

tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gtatgtagct cgttcctccga 156

Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu

25

30

ggggttctgt catttggaga cgcttattaa ttgggatcgc ag gcg aca tat gct 210

Ala Thr Tyr Ala

35

ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc ctg aac aac 258

Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu Leu Asn Asn

40

45

50

tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc atc ttc tca 306

Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr Ile Phe Ser

55

60

65

act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att tcc ctc gct 354

Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile Ser Leu Ala

70

75

80

ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt tcg ccc gaa 402

Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser Ser Pro Glu

85

90

95

aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat gag gaa cca 450

Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Pro

5 5 / 7 2

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 | 115 |
| gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca cca gta aag 498 | | | |
| Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser Pro Val Lys | | | |
| 120 | 125 | 130 | |
| ett cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tcg gga tcc cta tta tct ccc 546 | | | |
| Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu Leu Ser Pro | | | |
| 135 | 140 | 145 | |
| gat ccg aca aca tcc ccc atg tcg cca agt agt tct tca gct tca gga 594 | | | |
| Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ala Ser Gly | | | |
| 150 | 155 | 160 | |
| cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg agg tcg cta 642 | | | |
| His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg Arg Ser Leu | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| tta gaa gga gtt tcg ctt gat gtt ccg tca cat atc gac tcc aag gtc 690 | | | |
| Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp Ser Lys Val | | | |
| 180 | 185 | 190 | 195 |
| aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct agg gca acg 738 | | | |
| Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser Arg Ala Thr | | | |
| 200 | 205 | 210 | |

5 6 / 7 2

aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt ttg aca gtg 786

Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe Leu Thr Val

215

220

225

tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc ttg gcg gta 834

Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile Leu Ala Val

230

235

240

gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa gat ttt ggt 882

Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu Asp Phe Gly

245

250

255

act agt ctg gtaagctttc cttcagccat ggtccagtgc tcaccgtct 931

Thr Ser Leu

260

acttgccgta g atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt tcc ctc ggt 981

Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Leu Gly

265

270

275

ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act cct acg ccc 1029

Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr Pro Thr Pro

280

285

290

tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc ccg tcc cgg 1077

Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr Pro Ser Pro

57 / 72

295

300

305

ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc atc ctc gtc 1125

Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro Ile Leu Val

310

315

320

ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat tat cct gag 1173

Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp Tyr Pro Glu

325

330

335

cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc acc ctc gca 1221

His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Ala

340

345

350

355

ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg cag tgg ctt 1269

Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr Gln Trp Leu

360

365

370

cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat cag ctg tgg 1317

Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His Gln Leu Trp

375

380

385

tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc cgg tca ggt 1365

Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly Arg Ser Gly

390

395

400

58 / 72

atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct ggt tat ctt 1413

Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro Gly Tyr Leu

405

410

415

tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt tta agg ctc 1461

Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val Leu Arg Leu

420

425

430

435

agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca aat gaa gag 1509

Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr Asn Glu Glu

440

445

450

cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg att atg gag 1557

His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu Ile Met Glu

455

460

465

ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga ggc tgg att 1605

Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly Gly Trp Ile

470

475

480

tgg gcc ggc ggg gag gta tcc agg cgt tta gtaagtggac atcttttgta 1655

Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu

485

490

atattgtacc tataactaatc cctgcataaa g gcc aac gct cct tat gta ttt 1707

Ala Asn Ala Pro Tyr Val Phe

59/72

495

500

tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc tac ctc ctc ctt 1755

Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Leu

505

510

515

acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca tca cca tcg atc 1803

Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr Ser Pro Ser Ile

520

525

530

tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac ggt ctc gcg ata 1851

Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn Gly Leu Ala Ile

535

540

545

ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat gtg agc atg aag 1899

Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn Val Ser Met Lys

550

555

560

aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg tta atg ttg tat 1947

Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val Leu Met Leu Tyr

565

570

575

580

acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa gga cgg agg atc 1995

Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys Gly Arg Arg Ile

585

590

595

60/72

aag ata tagttaaagt gtttaccatg caggatactg agtatctcgg ttca

2045

Lys Ile

<210> 13

<211> 1797

<212> DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1794)

<400> 13

atg ggg gat tac aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca 48

Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro

1

5

10

15

ggt gct tct atc tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gcg 96

Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala

20

25

30

aca tat gct ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc 144

Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu

35

40

45

61/72

ctg aac aac tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc 192

Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr

50

55

60

atc ttc tca act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att 240

Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile

65

70

75

80

tcc ctc gct ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt 288

Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser

85

90

95

tcg ccc gaa aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat 336

Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp

100

105

110

gag gaa cca gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca 384

Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser

115

120

125

cca gta aag ctt cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tcg gga tcc cta 432

Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu

130

135

140

tta tct ccc gat ccg aca aca tcc ccc atg tcg cca agt agt tct tca 480

6 2 / 7 2

Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser

145 150 155 160

gct tca gga cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg 528

Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg

165 170 175

agg tcg cta tta gaa gga gtt tcg ctt gat gtt ccg tca cat atc gac 576

Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp

180 185 190

tcc aag gtc aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct 624

Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser

195 200 205

agg gca acg aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt 672

Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe

210 215 220

ttg aca gtg tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc 720

Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile

225 230 235 240

ttg gcg gta gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa 768

Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu

245 250 255

63 / 72

gat ttt ggt act agt ctg atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt 816

Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe

260

265

270

tcc ctc ggt ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act 864

Ser Leu Gly Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr

275

280

285

cct acg ccc tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc 912

Pro Thr Pro Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr

290

295

300

cgc tcc ccg ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc 960

Pro Ser Pro Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro

305

310

315

320

atc ctc gtc ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat 1008

Ile Leu Val Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp

325

330

335

tat cct gag cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc 1056

Tyr Pro Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe

340

345

350

acc ctc gca ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg 1104

64/72

Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr

355

360

365

cag tgg ctt cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat 1152

Gln Trp Leu Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His

370

375

380

cag ctg tgg tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc 1200

Gln Leu Trp Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly

385

390

395

400

cgg tca ggt atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct 1248

Arg Ser Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro

405

410

415

ggt tat ctt tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt 1296

Gly Tyr Leu Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val

420

425

430

tta agg ctc agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca 1344

Leu Arg Leu Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr

435

440

445

aat gaa gag cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg 1392

Asn Glu Glu His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu

450

455

460

6 5 / 7 2

att atg gag ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga 1440

Ile Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly

465

470

475

480

ggc tgg att tgg gcc ggc ggg gag gta tcc agg cgt tta gcc aac gct 1488

Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala

485

490

495

cct tat gta ttt tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc 1536

Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly

500

505

510

tac ctc ctc ctt acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca 1584

Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr

515

520

525

tca cca tcg atc tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac 1632

Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn

530

535

540

ggt ctc gcg ata ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat 1680

Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn

545

550

555

560

gtg agc atg aag aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg 1728

6 6 / 7 2

Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val

565

570

575

tta atg ttg tat acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa 1776

Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys

580

585

590

gga cgg agg atc aag ata tag

1797

Gly Arg Arg Ile Lys Ile

595

<210> 14

<211> 598

<212> PRT

<213> *Cryptococcus neoformans*

<400> 14

Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro

1

5

10

15

Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala

20

25

30

Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu

35

40

45

67 / 72

Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr

50

55

60

Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile

65

70

75

80

Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser

85

90

95

Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp

100

105

110

Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser

115

120

125

Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu

130

135

140

Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser

145

150

155

160

Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg

165

170

175

Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp

68 / 72

180

185

190

Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser

195

200

205

Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe

210

215

220

Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile

225

230

235

240

Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu

245

250

255

Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe

260

265

270

Ser Leu Gly Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr

275

280

285

Pro Thr Pro Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr

290

295

300

Pro Ser Pro Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro

305

310

315

320

6 9 / 7 2

Ile Leu Val Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp

325

330

335

Tyr Pro Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe

340

345

350

Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr

355

360

365

Gln Trp Leu Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His

370

375

380

Gln Leu Trp Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly

385

390

395

400

Arg Ser Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro

405

410

415

Gly Tyr Leu Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val

420

425

430

Leu Arg Leu Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr

435

440

445

Asn Glu Glu His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu

450

455

460

70 / 72

Ile Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly

465

470

475

480

Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala

485

490

495

Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly

500

505

510

Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr

515

520

525

Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn

530

535

540

Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn

545

550

555

560

Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val

565

570

575

Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys

580

585

590

Gly Arg Arg Ile Lys Ile

71 / 72

595

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

ggaattcatg tcgactttaa aacagagaaa agagg

35

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

7 2 / 7 2

gcacgcattt atagcttaat gaatattctt tttct atac

34

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 17

atggcaacag tacatcagga gaatatgtcg actttaaaac cggatccccg tcgtttaaac 60

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 18

ttatagctta atgaatattc tttttctata caagaaaacc gaattcgagc tcgtttaaac 60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/14909

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/15, C12N15/55 | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/15, C12N15/55 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 02/04626 A1 (Eisai Co., Ltd.), 17 January, 2002 (17.01.02), & EP 1300464 A1 & JP 2002-509480 A | 1-4 |
| P,A | WO 03/058233 A1 (Eisai Co., Ltd.), 17 July, 2003 (17.07.03), (Family: none) | 1-4 |
| P,X | UMEMURA M. et al., GWT1 gene is required for inositol acylation of glycosylphosphatidyino sitol anchors in yeast., J.Biol.Chem., 2003 January, Vol.278, No.26, pages 23639 to 23647 | 1-4 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 12 December, 2003 (12.12.03) | | Date of mailing of the international search report 24 December, 2003 (24.12.03) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q 1/02, G01N 33/50, G01N 33/15, C12N 15/55

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q 1/02, G01N 33/50, G01N 33/15, C12N 15/55

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| A | WO 02/04626 A1 (エーザイ株式会社) 2002. 01. 17 & EP 1300464 A1 & JP 2002-509480 A | 1-4 |
| PA | WO 03/058233 A1 (エーザイ株式会社) 2003. 07. 17 & (ファミリーなし) | 1-4 |
| PX | UMEMURA M. et al, GWT1 gene is required for inositol acylation of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. J. Biol. Chem. 2003 Jun., Vol. 278, No. 26, p. 23639-23647 | 1-4 |

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 03

国際調査報告の発送 24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448